

von Willebrand Factor Antigen

Instructions For Use

REF 5284

L'antigène du facteur von Willebrand (vWF:Ag)

Fiche technique

von Willebrand Faktor Antigens (vWF:Ag)

Anleitung

Antigene del fattore von Willebrand (vWF:Ag)

Istruzioni per l'uso

Factor antigenico de von Willebrand (vWF:Ag)

Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	8
Deutsch	15
Italiano	22
Español	29



For In Vitro Diagnostic Use**INTENDED USE**

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag) in citrated human plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag or Factor VIII-related protein) is a plasma protein found in circulation combined by non-covalent interactions with Factor VIII (FVIII:C), a procoagulant protein also known as the anti-hemophilic factor.

These two proteins show distinct biochemical and functional properties as well as different antigenic determinants; their plasma levels may vary independently of each other^{1,2}. Deficiency of FVIII causes classic hemophilia while deficiency of vWF causes von Willebrand disease. Most of vWF:Ag is synthesized and stored by endothelial cells while 15-20% is synthesized by megakaryocytes and stored in circulating platelets. A vWF:Ag unit has a molecular weight of about 250 kD and tends to polymerize in circulation, with multimers ranging in size from 850kD to as large as 15×10^6 D³. vWF:Ag plays a very important role in hemostasis; it protects FVIII from proteolytic cleavage in circulation and helps platelets to aggregate or to adhere to sites of vascular damage. The in vivo half-life of FVIII:C without vWF:Ag is shortened from 10-12 hours to a few minutes. These two mechanisms prevent bleeding. Von Willebrand disease is characterized by an inherited deficiency of vWF. A decreased vWF activity in plasma can be the result of low concentrations (quantitative or type I defect) or a deficient function of vWF (qualitative or type II defect)^{4,5}. Von Willebrand disease is the most common inherited bleeding disorder characterized by easy bruising and prolonged bleeding from mucosal surfaces. The prevalence of von Willebrand disease has been estimated to be 1-3% of the general population. Approximately 80% of von Willebrand disease patients have a type I deficiency⁶.

The laboratory diagnosis of von Willebrand disease may require both quantitative and qualitative (functional) determinations^{7,8}. Quantitative determinations are based on immunologic techniques such as radial immunodiffusion in gel and Laurell rocket immunoelectrophoresis. ELISA procedures⁹ applied to measure vWF:Ag are less labor intensive and offer several advantages including more objective, accurate and reproducible results. In addition, ELISA allows automation with commonly available laboratory instruments.

PRINCIPLE OF THE TEST

vWF: Ag assay is a sandwich ELISA. A capture antibody specific for human vWF is coated to 96-microwell polystyrene plates. Diluted patient plasma is incubated in the wells, allowing any available vWF:Ag to bind to the anti-human vWF antibody on the microwell surface. The plates are washed to remove unbound proteins or other plasma molecules. Bound vWF:Ag is quantitated using horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human vWF detection antibody.

Following incubation, unbound conjugate is removed by washing. A chromogenic substrate of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) is added to develop a colored reaction. The intensity of the color is measured in optical density (O.D.) units with a spectrophotometer at 450nm. Patient vWF:Ag in relative percent concentration is determined against a curve made from the reference plasma provided with the kit.

REAGENTS

Store at 2...8°C. Do Not Freeze.

Each von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag) 96-microwell Test Kit contains the following reagents:

- 12 x 8 anti-human von Willebrand Factor antibody coated microwells.
- 60mL Sample Diluent (blue-green solution); contains sodium azide.
- 3 x 0.5mL lyophilized Reference Plasma, with assay sheet.
- 12mL anti-human vWF HRP Conjugate (red solution).
- 13mL Substrate (TMB and H₂O₂).
- 15mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid).
- 30mL Wash Concentrate (33X phosphate buffered saline with 0.01% Tween 20).

NOTE: turbidity may appear in wash concentrate which will not affect component performance and should disappear when working dilution is prepared.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use

1. Human source material used to prepare the reference plasma included in this kit has been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV and HIV-I & II by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. One component substrate can cause irritation to the eyes and skin. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.
6. The Sample Diluent contains sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma collected with either 3.2% or 3.8% sodium citrate as an anticoagulant should be used as the sample matrix. Blood should be collected by venipuncture, and the sample centrifuged immediately. Remove the plasma and store at 2...8°C until testing can be performed. If not tested within 8 hours of collection, the sample should be stored at -70°C and tested within 1 month.

INSTRUCTIONS FOR USE

MATERIALS PROVIDED

von Willebrand Factor Antigen Test Kit; see "Reagents," for a complete listing.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- . vWF:Ag Control Plasma. Reconstitute Control Plasma selected for use following manufacturer's instructions, and store as recommended.
- . Reagent grade water (1L) to prepare PBS/Tween 20 wash solution, to reconstitute Reference Plasma, and to zero or blank the plate reader during the final assay step.
- . Graduated cylinders.
- . Precision pipettors capable of delivering between 5 and 1000 microliters, with appropriate tips.
- . Miscellaneous glassware appropriate for small volume handling.
- . Flask or bottle, 1 litre.
- . Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system.
- . Disposable gloves, powder-free recommended.
- . Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450nm (with a 650nm reference if available).
- . Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously.
- . Microdilution tubes for patient sample preparation.

PROCEDURAL NOTES

1. Bring plasma samples and kit reagents to room temperature (18...26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage (2...8°C) as soon as possible.
2. All dilutions of reference plasma, control plasma selected for use, and patient samples must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well should be set up on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200µL of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to zero or blank against this water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. An automated microtiter plate washing system can also be used.
5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual PBS/Tween 20 can cause inconsistent color development of the substrate solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and allows for more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Carefully controlled timing of all steps is critical. All reference plasma dilutions, controls and samples must be added to the microwells within a five minute period. Batch size of samples should not be larger than the amount that can be added within this time period.
8. For all incubations, the start of the incubation period begins upon the completion of reagent or sample addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures above or below normal room temperature (18...26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use kit components beyond expiration date.

13. Coated microwells, conjugate, and substrate are lot specific components that should not be used with different kit lots.

Reagent Preparation

1. Wash Solution - phosphate buffered saline (PBS)/Tween 20: Measure 30mL Wash Concentrate (33X PBS/Tween 20) and dilute to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS/Tween 20 solution at 2...8°C. Discard if solution shows signs of contamination.
2. Reconstitute Reference Plasma by adding 0.5mL reagent grade water. Swirl gently to mix. Allow to stand for 10 minutes before use for complete dissolution. Stable for 8 hours when stored at 2...8°C. Reconstitute appropriate control plasma following manufacturer's instructions, and store as recommended.

Assay Procedure

1. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
2. Assay each reference plasma dilution in duplicate. Duplicate determinations are also recommended for patient and control samples. One well should be run as a reagent blank; sample diluent without plasma is added to the well as explained in step 6 of this section. This well is treated the same as a patient sample in subsequent assay steps. A water blank well should be included with each plate; it is to remain empty until 200 μ L of reagent grade water is added at the completion of the assay, immediately prior to reading the plate. The water blank well is to be used to zero the plate reader.
3. Using the Reference Plasma provided with the kit, prepare six reference plasma dilutions as described below:

Volume Reference Plasma		Volume Sample Diluent		* Reference Level
30 μ l	+	500 μ l	=	150
20 μ l	+	500 μ l	=	100
15 μ l	+	500 μ l	=	75
10 μ l	+	500 μ l	=	50
10 μ l	+	1000 μ l	=	25
10 μ l	+	2000 μ l	=	12.5
**10 μ l	+	**4000 μ l	=	6.25

* Reference level value to be used for constructing reference curve only.

** Make one additional dilution if the assayed value of the Reference Plasma is $\geq 150\%$.

4. Prepare a 1:26 dilution of each patient sample and control plasma selected for use in Sample Diluent (blue green solution); e.g. 20 μ L sample added to 500 μ L Sample Diluent. Mix thoroughly.
5. Add 100 μ L of the dilutions (reference plasmas x 6, patient samples and controls) to the appropriate microwells.
6. Add 100mL of Sample Diluent to the reagent blank well. Leave the water blank well empty.
7. Incubate 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.

VON WILLEBRAND FACTOR ANTIGEN TEST KIT

- Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20). Each well should be filled with wash solution per wash. Wash solution in the empty well intended to serve as a water blank will not interfere with the procedure. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. The frame must be squeezed at the center on the top and bottom to retain microwell modules during washing. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid. Do not allow wells to dry out between steps.
- Add 100 μ L Conjugate (red) to each well (except the water blank well).
- Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the conjugate solution.
- Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20) as in step 8. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. Use a snapping motion to drain the liquid, and blot on absorbent paper after the final wash. Do not allow the wells to dry out.
- Add 100 μ L Substrate to each well (except for the water blank well) and incubate for 10 minutes at room temperature. Add the substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
- Add 100 μ L Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well (except for the water blank well) to stop the enzyme reaction. Be sure to add Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate Solution was added. Blue substrate will turn yellow and colorless substrate will remain colorless. Do not add Stopping Solution to the water blank well. Instead, add 200 μ L reagent grade water to the water blank well. Blank or zero the plate reader against the water blank well. Read the O.D. of each well at 450nm, against a 650nm reference filter (if available). For best results, the O.D. values should be measured within 30 minutes after the addition of Stopping Solution.

RESULTS

- Calculate the mean O.D. values for the duplicates of the reference plasma dilutions, controls selected for use, and patient samples.
- Plot the mean O.D. obtained for each dilution of the reference plasma (x axis) against the corresponding value of the reference level (y axis). The curve may be plotted on a linear, semi-log or log-log graph. Draw a line to connect the points.
- Using the mean O.D., determine the control and patient relative values from the graph, or alternatively, use linear regression to calculate from the reference curve.
- To calculate vWF:Ag levels in percent (%) of normal, multiply the control and patient relative values (obtained from the reference curve) by the assigned value for the Reference Plasma (see vial label).

For example:

Patient relative value (from the reference curve): 40

Reference Plasma assigned value: 105% of normal

Actual patient vWF:Ag value (as % of normal): $40 \times 1.05 = 42\%$

- Ensure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

QUALITY CONTROL

1. The mean O.D. of the reagent blank should be less than 0.1 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.1 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
2. O.D. values for the duplicates of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. value for samples with absorbance readings greater than 0.200.
3. vWF:Ag values obtained for the controls should fall within manufacturer's assigned ELISA ranges. Occasional small deviations outside these ranges may be acceptable.
4. Each laboratory should periodically determine their own reference range for this assay.

EXPECTED VALUES¹⁰

Normal Range: Plasma vWF:Ag values are generally expressed in relative percent (%) as compared to pooled normal plasma. The normal range when normal plasma samples were tested by Helena BioSciences vWF:Ag assay was 47 - 197% (mean 105.8%, SD 39%). This range is consistent with that published in the literature^{4,7} and reported by other commercially available assays (50-160%). Samples with values above the range of the reference curve may need to be diluted and retested for accurate results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS¹⁰

Detection range:

The detection range for Helena BioSciences vWF:Ag assay has been determined to be 5 - 200%. However, the effective range of each run will depend on the assayed value of the reference plasma. For greatest accuracy, samples which generate absorbance readings outside the O.D. range of the reference curve should be retested at an appropriate dilution.

Precision:

Intra-assay precision:

To determine variability within a plate, three plasma samples with known vWF levels (one high, one medium, and one low) were tested in 16 wells by two operators, on six plates from each of three lots. The data, presented in the following table, shows a mean CV of 3.6% across three lots. In addition, ninety-nine (99) patient samples with vWF levels ranging from 54 - 276% of normal were tested in duplicate across 3 lots to demonstrate the precision end users may expect when performing the assay according to package insert instructions. As shown in the table, the overall mean CV for duplicates was 2.5%.

Inter-assay precision:

Ten (10) commercially prepared, assayed plasma samples with vWF values ranging from 57 - 159% were tested in duplicate on three lots to determine assay precision between lots. The mean inter-assay CV was 5%, as seen in the table:

VON WILLEBRAND FACTOR ANTIGEN TEST KIT

Intra-assay precision (variability within a plate)	vWF range (% of normal)	CV range (3 pilot lots)	Overall mean CV:
Replicates (x16):	149% - 155%	1.9 - 7.9%	
	75% - 89%	2.2 - 7.7%	
	57% - 83%	1.8 - 9.9%	3.6%
Duplicates:	54% - 276%		2.5%
Inter-assay precision (variability between lots) Duplicates:	57% - 159%	3.0 - 12.1%	5.0%

Linearity:

Serial two-fold dilutions of vWF reference plasma samples tested on three lots of Helena BioSciences vWF:Ag assay demonstrated curves with a mean coefficient of determination (r-squared) of 0.995; individual point recovery ranged from -10.7% to +14.0%.

Accuracy:

Accuracy was determined by testing mixtures of reference plasma with predetermined values on Helena BioSciences vWF:Ag assay and calculating the recovery of theoretical values. The overall mean percent recovery across 3 lots was 103.6% with an average variation of 5.7%.

LIMITATIONS OF THE TEST

The vWF:Ag levels obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures. There is a normal plasma fluctuation of vWF:Ag due to unknown mechanisms. For this reason, repeat testing may be necessary. In addition, vWF:Ag acts as an acute phase reactant; it may be increased in various stressful conditions and diseases including pregnancy, oral contraceptives, surgery, liver and autoimmune diseases, prostate cancer, etc.^{4,5}

Plasma samples can be inadvertently depleted or degraded of vWF:Ag by improper collection or laboratory processing. Individuals with "O" blood type have been shown to have lower plasma levels of vWF:Ag (~25%) when compared to those with other blood types. Acquired von Willebrand disease has been reported in some patients with lymphoproliferative disease⁷.

As with any assay employing antibodies from an animal source (e.g. mouse, rabbit, goat, etc.) to capture a target molecule, the possibility exists for interference in the serum or plasma of patients who have been exposed to preparations containing animal antibodies for diagnosis or therapy. Falsely elevated or depressed values may be seen in these patients.

Pour utilisation diagnostique in vitro

UTILISATION ENVISAGEE

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative de l'antigène du facteur von Willebrand (vWF:Ag) dans le plasma citrate.

PRINCIPE DU TEST

Le dosage vWF:Ag Helena BioSciences est un dosage immunoenzymatique en sandwich. Une couche d'anticorps de capture spécifique du vWF est déposée sur des plaques en polystyrène à 96 microcuvettes. Le plasma patient dilué est incubé dans les cuvettes en laissant tout le vWF:Ag se lier à l'anticorps anti-vWF à la surface des microcuvettes. Les plaques sont lavées afin de retirer les protéines non liées et autres molécules du plasma. Le vWF:Ag lié est quantifié à l'aide d'un anticorps de détection anti-vWF conjugué à la peroxydase du raifort (PR). Après incubation, le conjugué non lié est enlevé par lavage. Un substrat chromogène de tétraméthylbenzène (TMB) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est ajouté pour développer une réaction colorée. L'intensité de la couleur à 450nm est mesurée en unités de densité optique (D.O.) à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration relative en pourcentage du vWF:Ag est déterminée sur une courbe établie à l'aide du plasma de référence fourni dans le kit.

REACTIFS

Stocker entre 2...8°C. Ne pas congeler.

Chaque kit d'antigène du facteur von Willebrand (vWF:Ag) pour 96 microcuvettes contient les réactifs suivants :

- 12 x 8 microcuvettes coâtées avec les anticorps anti-facteur von Willebrand (96 Antibody Coated Microwells).
- 60ml de tampon pour échantillon (solution bleu vert) ; contient de l'azide de sodium (Sample Diluent III).
- 3 flacons de 0,5 ml de plasma de référence lyophilisé, avec feuille de dosage (Reference Plasma).
- 12 ml de conjugué anti-vWF PR (solution rouge) (HRP Conjugated Antibody).
- 13 ml de substrat (TMB et H_2O_2) (One-component Substrate).
- 15 ml de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) (Stopping Solution).
- 30 ml de concentré de lavage (33X SPTP avec 0,01 % de Tween 20). **REMARQUE** : le concentré de lavage peut présenter une turbidité qui n'affecte pas la performance du composant et doit disparaître lors de la préparation de la solution de travail (Wash Concentrate).

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Pour utilisation diagnostique in vitro

1. Les produits d'origine humaine utilisés pour préparer le plasma de référence inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAg, anti-HCV et anti-HIV-I & II selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons des patients, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.

L'ANTIGENE DU FACTEUR VON WILLEBRAND (VWF:AG)

5. La solution substrat a un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Une absorption a travers la peau est possible. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement apres la manipulation. Tenir les reactifs eloignés des sources de chaleur. Eviter tout contact avec des agents oxydants.
6. Le tampon pour echantillon contient de l'azide de sodium a titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avere former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laisse au contact de ces metaux. Ces azides metalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit etre abondamment rincee a l'eau afin d'eviter l'accumulation d'azides metalliques explosifs dans la plomberie.

COLLECTE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La matrice de l'échantillon doit etre constituee de plasma preleve avec 3,2 % ou 3,8 % de citrate de sodium a titre d'anticoagulant. Le sang doit etre preleve par ponction veineuse et l'échantillon doit etre immediatement centrifuge. Retirer le plasma et stocker entre 2...8°C jusqu'au moment ou le dosage peut etre effectue. S'il n'est pas dose dans les huit heures du prelevement, l'échantillon doit etre stocke a -70°C et dose dans le mois.

MODE D'EMPLOI

MATERIEL FOURNI

Kit d'antigene du facteur von Willebrand; voir la liste complete sous 'Reactifs'.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Plasma de controle du vWF:Ag : Suivre les instructions du fabricant pour reconstituer le plasma de controle choisi en vue de son utilisation et stocker ainsi qu'il est recommande.
- Eau pure pour analyse (1 L) pour preparer la solution mere SPTP/Tween 20, pour reconstituer le plasma de reference et pour mettre au zero ou effacer le lecteur de plaque durant l'etape finale du dosage
- Cylindres gradues
- Pipettes de precision capables de delivrer entre 5 et 1000 μ l, avec embout approprie
- Articles en verre convenant a la manipulation de petits volumes
- Flacon ou bouteille de 1 litre
- Des pissettes, de preference munies d'un goulot partiellement decoupe pour autoriser un debit elargi, ou bien un systeme de lavage automatique ou semi-automatique
- Gants a usage unique, de preference non talques
- Spectrophotometre de lecture de plaque capable de lire l'absorbance a 450 nm (avec une reference a 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanaux capables d'alimenter 8 cuves simultanement
- Tubes de microdilution pour la preparation des echantillons des patients

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

1. Amener les echantillons de plasma et les reactifs a temperature ambiante (18...26°C) et bien melanger avant l'utilisation, eviter la formation de mousse. Remettre des que possible tous les echantillons et reactifs inutilises dans le refrigerateur (2...8°C).
2. Toutes les dilutions de plasma de reference, de plasma de controle a utiliser choisi et d'échantillons des patients doivent etre effectuees juste avant leur utilisation pour le dosage.

3. Une cuve du blanc eau doit être incluse dans chaque dosage. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à cette cuve. Ajouter à la place à cette cuve 200 µl d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être programmé sur le zéro ou à vide sur cette cuve d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des microcuvettes à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. L'utilisation de solution mère dans la cuve du blanc eau n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de micro-titration.
5. **IMPORTANT:** L'élimination imparfaite des résidus SPTP/Tween 20 risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanaux capable d'alimenter 8 cuvettes simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de toutes les cuvettes.
7. Respecter impérativement la durée des étapes. Tous les plasmas de référence dilués, contrôles et échantillons doivent être ajoutés aux microcuvettes en cinq minutes au plus. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Toutes les étapes d'incubation commencent au moment de l'addition du réactif ou de l'échantillon.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18...26°C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
13. Les microcuvettes, le conjugué et le substrat sont des composants spécifiques d'un lot, ne pas les utiliser avec des kits d'autres lots.

Préparation des réactifs

1. Solution mère - sérum physiologique tamponné au phosphate (SPTP)/Tween 20 : Mesurer 30 ml de concentré de lavage (SPTP 33x/Tween 20) et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Stocker la solution mère non utilisée entre 2...8°C. Jeter si la solution montre des signes de contamination.
2. Reconstituer le plasma de référence en ajoutant 0,5 ml d'eau pure pour analyse. Agiter doucement pour mélanger. Laisser reposer 10 minutes pour une dissolution complète avant l'utilisation. Reste stable 8 heures si stocké entre 2...8°C. Reconstituer le plasma de contrôle selon les instructions du fabricant et stocker ainsi qu'il est recommandé.

Procédure de dosage

1. Retirer toutes les barrettes de microcuvettes qui ne seront pas utilisées du cadre et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
2. Doser en double chaque dilution de plasma de référence. La détermination en double des échantillons des patients et des contrôles est aussi recommandée. Une cuvette doit être utilisée pour le blanc réactif : Du tampon pour échantillon sans plasma est ajouté à la cuvette ainsi qu'expliqué à l'étape 6 de cette section. Cette cuvette sera traitée de la même manière qu'un échantillon de patient dans les étapes suivantes du dosage. Une cuvette du blanc eau doit être incluse avec chaque plaque ; elle doit rester vide jusqu'à l'ajout de 200 µl d'eau pure pour analyse à la fin du dosage, immédiatement avant la lecture de la plaque. La cuvette du blanc eau sert à la mise au zéro du lecteur

L'ANTIGENE DU FACTEUR VON WILLEBRAND (VWF:AG)

de plaque.

3. En utilisant le plasma de reference fourni avec le kit, preparer six dilutions de plasma de reference ainsi que decrit ci-dessous :

Volume Plasma de Reference		Volume Tampon pour échantillon		* Niveau de référence
30 μ l	+	500 μ l	=	150
20 μ l	+	500 μ l	=	100
15 μ l	+	500 μ l	=	75
10 μ l	+	500 μ l	=	50
10 μ l	+	1000 μ l	=	25
10 μ l	+	2000 μ l	=	12,5
**10 μ l	+	**4000 μ l	=	6,25

* La valeur du niveau de reference ne doit etre utilisee que pour tracer la courbe de reference.

** Preparer une dilution supplementaire si la valeur du dosage du plasma de reference est \geq 150 %.

4. Preparer une dilution a 1:26 de chaque echantillon de patient et du plasma de controle choisi pour utilisation dans du tampon pour echantillon (solution bleu vert), c.- a-d. ajouter 20 μ l d'echantillon a 500 μ l de tampon pour echantillon. Bien melanger.
5. Ajouter 100 μ l des dilutions (plasmas de reference x 6, echantillons des patients et des controles) aux microcuves appropriees.
6. Ajouter 100 μ l de tampon pour echantillon a la cuve de blanc reactif. Laisser vide la cuve destinee au blanc eau.
7. Laisser incuber 15 minutes a temperature ambiante. Lorsque l'incubation est terminee, retourner avec precaution les microcuves et jeter le liquide. Ne pas laisser les echantillons contaminer les autres microcuves.
8. Laver 4 fois a l'aide de solution mere de travail (SPTP/Tween 20). Chaque cuve doit etre remplie de solution mere a chaque lavage. L'utilisation de solution mere dans la cuve vide destinee a servir de cuve du blanc eau n'interfere pas avec la procedure. Retourner les microcuves entre chaque lavage pour evacuer le liquide. Secouer le liquide des cuves d'un mouvement sec du poignet. Faire pression sur le centre de la partie superieure et de la partie inferieure du portoir afin de retenir les barrettes au cours du lavage. Eponger sur du papier absorbant pour eliminer les residus de liquide de lavage. Ne pas laisser secher les cuves entre les etapes.
9. Ajouter 100 μ l de conjugue (rouge) a chaque cuve (excepte la cuve du blanc eau).
10. Laisser incuber 15 minutes a temperature ambiante. Lorsque l'incubation est terminee, retourner avec precaution les microcuves et jeter la solution conjuguee.
11. Laver 4 fois a l'aide de solution mere de travail (SPTP/Tween 20) ainsi qu'a l'etape 8. L'utilisation de solution mere dans la cuve du blanc eau n'interfere pas avec la procedure. Apres le dernier lavage, retourner la plaque d'un mouvement sec du poignet et eponger le liquide restant sur du papier absorbant. Ne pas laisser secher les cuves entre les etapes.
12. Ajouter 100 μ l de solution substrat dans chaque cuve (excepte la cuve du blanc eau) et laisser incuber 10 minutes a temperature ambiante. Ajouter de la solution substrat aux cuves a un rythme constant. Une couleur bleue se developpe dans les cuves avec echantillon positif.

13. Ajouter 100 μ l de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) a chaque cuve (excepte la cuve du blanc eau) pour arreter la reaction enzymatique. Veiller a ajouter la solution d'arrêt aux cuves dans le meme ordre et au meme rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution substrat incolore reste incolore. Ne pas ajouter de solution d'arrêt a la cuve du blanc eau. A la place, ajouter dans la cuve du blanc eau 200 μ l d'eau pure pour analyse. Annuler ou mettre au zero le lecteur de plaque sur la cuve du blanc eau. Lire la D.O. de chaque cuve a 450nm au regard d'un filtre de reference a 650 nm (si disponible). Pour un resultat optimal, la D.O. doit etre mesuree dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt

RESULTATS

1. Calculer la D.O. moyenne des doubles dilutions de plasma de reference, des controles retenus pour utilisation et des echantillons des patients.
2. Reporter les valeurs de la D.O. moyenne obtenues pour chaque dilution du plasma de reference (abscisse) sur la valeur correspondante du niveau de reference (ordonnee). La courbe peut etre tracee en coordonnees lineaires, semi-logarithmiques ou logarithmiques. Tracer une ligne joignant les points.
3. Utiliser la D.O. moyenne pour determiner les valeurs de controle et patient relatives sur la courbe; on peut aussi calculer par regression lineaire a partir de la courbe de reference.
4. Pour calculer la valeur de vWF:Ag en % de la normale, multiplier les valeurs de controle et patient relatives (obtenues sur la courbe de reference appropriee) par la valeur assignee correspondante du plasma de reference (voir l'etiquette du flacon).

Par exemple :

Valeur patient relative (sur la courbe de reference) : 40

Valeur assignee du plasma de reference : 105 % de la normale

Valeur reelle de vWF:Ag patient (en % de la normale) : $40 \times 1,05 = 42 \%$

5. S'assurer que tous les parametres du controle qualite sont remplis (voir Controle qualite) avant de communiquer les resultats des tests.

CONTROLE QUALITE

1. La D.O. moyenne obtenue pour le blanc reactif doit etre inferieure a 0,1 lorsque le zero du spectrophotometre a ete realise sur l'eau. Une valeur superieure a 0,1 indique une contamination ou que la plaque a ete mal lavee.
2. Les valeurs de densite optique pour les doubles des controles ou des echantillons des patients ne doivent pas differer de plus de 20 % de la valeur moyenne des echantillons dont les resultats d'absorbance sont superieurs a 0,200.
3. Les valeurs de vWF:Ag obtenues pour les controles doivent etre comprises dans les plages de dosage immunoenzymatique assignees du fabricant. De petites variations occasionnelles peuvent etre tolerees.
4. Chaque laboratoire doit determiner regulierement ses propres plages de reference pour ce dosage.

L'ANTIGENE DU FACTEUR VON WILLEBRAND (vWF:AG)

VALEURS NORMALES¹⁰

Plage normale : Les valeurs de vWF:Ag du plasma sont généralement exprimées en pourcentage relatif (%) par rapport à une réserve de plasma normal. La plage normale d'échantillons de plasma normal dosés à l'aide du dosage vWF:Ag est de 47 - 197% (moyenne 105,8%, E-T 39%). Cette plage est cohérente avec les plages normales publiées dans la littérature^{4,7} et rapportées pour les autres dosages commercialisés (50 à 160 %). Pour un résultat précis, on peut devoir diluer et doser à nouveau les échantillons dont les valeurs dépassent la plage de la courbe de référence.

PERFORMANCES¹⁰

Intervalle de détection :

L'intervalle de détection du dosage Helena BioSciences AgFvW a été déterminé comme étant de 5% - 200%. Cependant, l'intervalle effectif de chaque série dépendra de la valeur dosée du plasma de référence. Pour une meilleure précision, les échantillons qui génèrent des lectures d'absorbance hors de l'intervalle de DO de la courbe de référence doivent être ré-analysés à une dilution appropriée.

Précision :

Précision intra-série :

Pour déterminer la variabilité au sein d'une plaque, trois échantillons de plasma avec des taux de FvW connus (un élevé, un moyen et un faible) ont été analysés par deux opérateurs dans 16 puits, sur six plaques provenant de trois lots. Les données, présentées dans le tableau suivant, montrent un CV de 3,6% sur les trois lots. En outre, 99 échantillons patients avec des taux de FvW allant de 54% à 276% de la normale ont été analysés en double sur 3 lots pour démontrer la précision que les utilisateurs peuvent attendre lors de la réalisation du dosage conformément aux instructions de la fiche technique. Comme indiqué dans le tableau, le CV moyen global des échantillons en double était de 2,5%.

Précision inter-série :

10 échantillons de plasma dosés et préparés commercialement avec des taux de FvW allant de 57% à 159% ont été analysés en doubles sur trois lots afin de déterminer la précision du dosage d'un lot à l'autre. Le CV moyen inter-série était de 5%, comme indiqué dans le tableau :

Précision intra-série (variabilité au sein d'une plaque)	Intervalle FvW (% de la normale)	Intervalle de CV(3 lots pilotes)	CV moyen global:
Réplicats (16x) :	149% - 155%	1,9 - 7,9%	
	75% - 89%	2,2 - 7,7%	
	57% - 83%	1,8 - 9,9%	3,6%
Échantillons en double :	54% - 276%		2,5%
Précision inter-série (variabilité d'un lot à l'autre) Échantillons en double :	57% - 159%	3,0 - 12,1%	5,0%

Linéarité :

Des dilutions sérielles (deux fois de suite) d'échantillons de plasma de référence FvW analysées sur trois lots du dosage Helena BioSciences AgFvW ont démontré des courbes avec un coefficient de détermination moyen (r^2) de 0,995, avec un taux de détection individuel allant de -10,7% à +14,0%.

Précision :

La précision a été déterminée en analysant des mélanges du plasma de référence ayant des valeurs prédéterminées avec le dosage Helena BioSciences AgFvW et en calculant le taux de détection des valeurs théoriques. Le taux de détection moyen global sur les 3 lots était de 103,6% avec une variation moyenne de 5,7%.

LIMITES DU TEST

Les valeurs obtenues de vWF:Ag constituent seulement une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Des mécanismes inconnus entraînent des fluctuations normales du vWF:Ag du plasma. Pour cette raison on peut devoir répéter les dosages. En outre, le vWF:Ag agit en tant que réactif de phase et peut augmenter lors de diverses situations de stress et maladies, y compris la grossesse, le traitement contraceptif oral,^{4,5} les interventions chirurgicales, les maladies auto-immunes et hépatiques, le cancer de la prostate etc.

Un prélèvement ou un traitement de laboratoire incorrect risque d'épuiser ou de diminuer le vWF:Ag des échantillons de plasma. Comparés aux sujets d'autres groupes sanguins, les sujets de type 'O' se sont avérés présenter un niveau inférieur du vWF:Ag du plasma (~ 25 %). Des cas de maladie de von Willebrand acquise ont été rapportés chez des patients avec syndrome lymphoprolifératif.⁷

Comme pour tout dosage utilisant un anticorps d'origine animale (p. ex. souris, lapin, chèvre etc.) pour capturer une molécule cible, il y a un risque d'interférence dans le sérum ou le plasma de patients ayant été exposés à des préparations contenant des anticorps animaux dans le cadre d'un diagnostic ou d'un traitement. Ces patients peuvent présenter des valeurs faussement élevées ou basses.

In-vitro-Diagnostikum

ANWENDUNGSGEBIET

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zum quantitativen Nachweis des von Willebrand Faktor Antigens (vWF:Ag) in Zitrushumanplasma.

TESTPRINZIP

Beim vWF:Ag Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Die 96 Mikrovertiefungen der Polystyrolplatten sind mit Capture-Antikörpern beschichtet, die spezifisch mit Human-vWF reagieren. Bei der Inkubation von verdünntem Patientenplasma in den Mikrovertiefungen wird das verfügbare vWF:Ag an die Antihuman-vWF-Antikörper auf der Oberfläche der Mikrovertiefungen gebunden. Die Platten werden gewaschen, um nichtgebundene Proteine und andere Moleküle aus dem Plasma zu entfernen. Gebundenes vWF:Ag wird mit Hilfe von Antihuman-vWF-Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert sind, quantitativ bestimmt. Nichtgebundenes Konjugat wird nach der Inkubation durch Waschen entfernt. Ein chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird hinzugefügt, um eine Farbreaktion hervorzurufen. Die Farbintensität wird mit einem Spektrophotometer bei 450nm gemessen und in optischen Dichteeinheiten (OD/cm) angegeben. Die relative Konzentration von vWF:Ag in Patientenplasma wird anhand einer Kurve bestimmt, die mit Hilfe des im Kit enthaltenen Referenzplasmas erstellt wurde (in %).

REAGENZILIEN

Bei 2...8°C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder Testkit für von Willebrand Faktor Antigen (vWF:Ag) (96 Mikrovertiefungen) enthält die folgenden

Reagenzien:

- Mit Antihuman-Antikörpern gegen von Willebrand Faktor beschichtete Mikrovertiefungen (12 x 8) (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml Probenverdünner (blaugrüne Lösung); enthält Natriumazid (Sample Diluent III).
- 3 x 0,5 ml lyophilisiertes Referenzplasma mit Test blatt (Reference Plasma).
- 12 ml Antihuman-vWF-HRP-Konjugat (rote Lösung) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml Substrat (TMB und H_2O_2) (One-component Substrate).
- 15 ml Stopplösung (15,0 N Schwefelsäure) (Stopping Solution).
- 30 ml Waschkonzentrat (33X phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,01% Tween 20).

HINWEIS: Das Waschkonzentrat kann Trübungen aufweisen, die sich jedoch nicht negativ auswirken und beim Herstellen der Arbeitsverdünnung verschwinden sollten (Wash Concentrate).

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung des in diesem Kit enthaltenen Referenzplasmas wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV, HIV-I und HIV II reagierten. Trotzdem sollten alle humanen Blutprodukte einschließlich Patientenproben als potenzielle Infektionsquellen gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.

4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Die Einkomponenten-Substratlösung kann Augen- und Hautreizungen verursachen. Absorption durch die Haut ist möglich. Substrat nur mit Handschuhen handhaben und anschließend gründlich die Hände waschen. Reagenzien von Zündquellen fernhalten. Kontakt mit Oxidationsmitteln vermeiden.
6. Der Probenverdünner enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Lösungen, die ein Azid enthalten, müssen, wenn sie ausgeschüttet werden, mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in Wasserrohren zu vermeiden.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Als Probenmatrix sollte Plasma verwendet werden, dem Natriumzitat (3,2% oder 3,8%) als Antikoagulantium beigefügt wurde. Blut sollte durch Venenpunktion gewonnen und die Probe sofort zentrifugiert werden. Das Plasma abtrennen und bis zum Test bei 2...8°C lagern. Falls der Test nicht innerhalb von 8 Stunden nach Blutabnahme durchgeführt werden kann, sollte die Probe bei -70°C gelagert und innerhalb eines Monats verwendet werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

Testkit für von Willebrand Faktor Antigen; siehe "Reagenzien" mit einer vollständigen Auflistung.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

- Kontrollplasma für vWF:Ag; das zur Verwendung gewählte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern.
- Analysenreines Wasser (1 L) zur Herstellung der PBS/Tween 20-Waschlösung, zur Rekonstitution von Referenzplasma und zum Nullabgleich des Platten- Lesegeräts während des letzten Testschritts.
- Messzylinder
- Präzisionspipetten mit dazu passenden Pipettenspitzen zum Abpipettieren von 5 bis 1000 Mikroliter
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumina
- Kolben oder Flasche, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit teilweise zugeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, bzw. ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe, vorzugsweise talkumfrei
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten, mit dem die Extinktion bei 450 nm bestimmt werden kann (wobei gegebenenfalls als Referenzwellenlänge 650 nm gewählt wird)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können
- Mikropipetten zur Herstellung der Patientenproben

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

1. Plasmaproben und Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18...26°C) bringen und vor Gebrauch gründlich durchmischen - nicht aufschäumen. Alle nicht gebrauchten Proben und Reagenzien so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank/Kühlraum (2...8°C) zurückstellen.

VON WILLEBRAND FAKTOR ANTIGENS (VWF:AG)

2. Alle Verdünnungen von Referenzplasma, zur Verwendung vorgesehenem Kontrollplasma und Patientenproben dürfen erst kurz vor der Verwendung im Test hergestellt werden.
3. Für jeden Testlauf sollte auf jeder Platte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. Dieser Vertiefung werden weder Probenmaterial noch Kitreagenzien beigefügt. Stattdessen werden in diese Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Mikrotiterplatte im Spektrophotometer 200 µl analysenreines Wasser pipettiert. Das Mikrotiterplatten-Lesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich anhand dieser mit Wasser gefüllten Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik notwendig. Genügendes Waschen lässt sich am besten erreichen, indem ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Die Waschlösung in der für Wasser vorgesehenen Vertiefung stört den Ablauf des Tests nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. **WICHTIG:** Wenn das restliche PBS/Tween 20 nicht ausreichend entfernt wird, kann eine richtige Farbentwicklung der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Die Durchführung des Tests wird so beschleunigt. Außerdem unterscheiden sich Inkubations- und Reaktionszeiten für die Vertiefungen weniger voneinander.
7. Exakte Zeitkontrolle bei allen Testschritten ist wichtig. Alle Referenzplasmaverdünnungen, Kontrollen und Proben müssen innerhalb eines Zeitraums von 5 Minuten zugegeben werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieser Zeit zugefügt werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit der Komplettierung der Reagenz- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der Raumtemperatur (18...26°C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der Fläschchen und Entfernen aliquoter Teile sollte eine Kontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.
13. Beschichtete Mikrovertiefungen, Konjugat und Substrat sind chargenspezifische Komponenten, die nicht mit anderen Chargen zusammen verwendet werden dürfen.

Vorbereitung der Reagenzien

1. Waschlösung - phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)/Tween 20: 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS/Tween 20) abmessen und auf 1 Liter mit analysenreinem Wasser auffüllen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte $7,35 \pm 0,1$ sein. Nicht aufgebrauchte PBS/Tween 20-Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Bei ersten Anzeichen einer Kontamination ist die Lösung zu verwerfen.
2. Das Referenzplasma durch Zugabe von 0,5 ml analysenreinen Wassers rekonstituieren. Zum Durchmischen vorsichtig mit Drehbewegung schütteln. Vor Verwendung 10 Minuten stehen lassen, damit eine vollständige Auflösung gewährleistet ist. Bei Lagerung zwischen 2...8°C 8 Stunden stabil. Das benötigte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern.

Durchführung des ELISA

1. Nicht benötigte Mikroplattenstreifen aus der Halterung entfernen und im Beutel aufbewahren.
2. Jede Referenzplasmaverdünnung doppelt testen. Für die Patienten- und Kontrollproben werden ebenfalls Doppelnachweise empfohlen. Eine Vertiefung sollte als Blindprobe verwendet werden. Der Probenverdünner ohne Plasma wird wie in Schritt 6 dieses Abschnitts erklärt in die Vertiefung pipettiert. Diese Vertiefung wird im weiteren Testablauf wie eine Patienten-Probe behandelt. Bei jeder Mikrotiterplatte ist eine Vertiefung für den Substratleerwert zu reservieren; diese Vertiefung bleibt bis zum Ende des Tests leer, erst direkt vor dem Auswerten der Mikrotiterplatte wird sie mit 200 μl analysenreinem Wasser gefüllt. Der Substratleerwert wird zur Nulleinstellung des Mikrotiterplatten-Lesegeräts verwendet.
3. Anhand des im Kit enthaltenen Referenzplasmas wie nachfolgend beschrieben sechs Referenzplasmaverdünnungen herstellen.

Volumen Referenz-plasma		Volumen Proben-verdünner		* Referenz-konzentrations-wert
30 μl	+	500 μl	=	150
20 μl	+	500 μl	=	100
15 μl	+	500 μl	=	75
10 μl	+	500 μl	=	50
10 μl	+	1000 μl	=	25
10 μl	+	2000 μl	=	12.5
**10 μl	+	**4000 μl	=	6.25

- * Der Referenzkonzentrationswert darf nur zum Erstellen der Eichkurve verwendet werden.
- ** Wenn für das Referenzplasma ein Wert von = 150% erhalten wird, ist eine zusätzliche Verdünnung herzustellen.
4. Von jeder Patientenprobe und der zur Verwendung gewählten Kontrollplasmaprobe eine 1:26 Verdünnung mit Probenverdünner (blaugrüne Lösung) herstellen; Beispiel: 20 μl Probe zu 500 μl Probenverdünner pipettieren. Gründlich durchmischen.
 5. 100 μl der Verdünnungen (Referenzplasmaproben x 6, Kontrollen und Patientenproben) in die betreffenden Mikrovertiefungen pipettieren.
 6. 100 μl des Probenverdünners I in die für das Reagenz vorgesehene Vertiefung pipettieren. Die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung bleibt leer.
 7. Es wird 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
 8. Viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschen mit Waschlösung gefüllt werden. Die Waschlösung in der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung stört den Ablauf des Tests nicht. Nach jedem Waschschrift wird die Waschlösung durch Umdrehen der Vertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine Schleuderbewegung mit dem Handgelenk aus den Vertiefungen geschlagen. Der Streifenhalter muss in der Mitte, oben und unten festgedrückt werden, um ein Herausfallen der Mikrostreifen zu vermeiden. Nach dem Entleeren die Mikroplatte auf einer saugfähigen Unterlage abtupfen, damit die restliche Waschlösung abgesaugt wird. Die Vertiefungen dürfen zwischen den Waschschriften nicht austrocknen.

9. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für den Substratleerwert vorgesehenen) 100 μ l Konjugat (rot) geben.
10. Dann wird 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
11. Wie in Schritt 8 viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Die Waschlösung in der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung stört den Ablauf des Tests nicht. Nach dem letzten Waschvorgang durch rasche Bewegungen die Flüssigkeit abfließen lassen und auf einem absorbierenden Papier trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen!
12. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für die Wasser- Blindprobe vorgesehenen) 100 μ l Substrat pipettieren und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. HS enthaltende Vertiefungen färben sich blau.
13. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung (außer der für den Substratleerwert vorgesehenen Vertiefung) beendet. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie die Substratlösung den Vertiefungen zugesetzt werden. Das blaue Substrat schlägt nach gelb um, während das farblose Substrat farblos bleibt. In die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung wird keine Stopplösung gegeben. Stattdessen wird diese Vertiefung für die Wasser-Blindprobe mit 200 μ l analysenreinem Wasser gefüllt. Anhand des Substratleerwerts wird der Nullpunkt des Mikrotiterplatten-Lesegeräts eingestellt. Für jede Vertiefung die optische Dichte (OD) bei 450 nm gegen einen 650-nm-Referenzfilter (sofern verfügbar) ablesen. Im Interesse bestmöglicher Ergebnisse sollten die OD-Werte innerhalb von 30 Minuten nach Beifügen der Stopplösung abgelesen werden.

ERGEBNISSE

1. Aus den Doppelnachweisen der Referenzplasmaverdünnungen, der ausgewählten Kontrollen und Patientenproben die mittleren OD-Werte berechnen.
2. Den für jede Verdünnung des Referenzplasmas erhaltenen mittleren OD-Wert (x-Achse) gegen den entsprechenden Referenzkonzentrationswert (y-Achse) auftragen. Die Kurve kann als lineare, halblogarithmische oder volllogarithmische (log-log) Darstellung erstellt werden. Die Punkte durch eine Linie miteinander verbinden.
3. Anhand des mittleren OD-Werts die relativen Werte für Kontrolle und Patientenproben aus der grafischen Darstellung bestimmen; alternativ können die Werte durch lineare Regression aus der Eichkurve berechnet werden.
4. Zur Berechnung des Gehalts an vWF:Ag (in % relativ zum Normalwert) die aus der Eichkurve erhaltenen relativen Werte für Kontrollen und Patientenproben mit dem festgesetzten Wert für das Referenzplasma multiplizieren (siehe Fläschchenetikett).

Beispiel:

Relativer Patientenwert (aus Eichkurve): 40

Zugehöriger Referenzplasmawert: 105% des Normalwerts

Wert für vWF:Ag in Patientenprobe (in % relativ zum Normalwert): $40 \times 1,05 = 42\%$

5. Bevor die Analyseergebnisse berichtet werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Qualitätskontrolle).

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Wenn das Spektrophotometer gegen Wasser auf null gestellt wurde, muss die mittlere OD der Blindprobe kleiner als 0,1 sein. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
2. Bei Proben mit einer Extinktion von mehr als 0,200 sollten die einzelnen OD-Werte der Doppelnachweise der Kontrollen oder Patientenproben nicht mehr als 20% vom durchschnittlichen OD abweichen.
3. Für die Kontrollen erhaltene Werte für vWF:Ag sollten innerhalb des vom Hersteller für ELISA-Tests festgesetzten Bereichs liegen. Gelegentliche, geringe Abweichungen von diesem Bereich können toleriert werden.
4. Jedes Labor sollte regelmäßig den eigenen Referenzbereich für diesen Test festlegen.

NORMALWERTE¹⁰

Normalbereich: Die Konzentration an vWF:Ag in Plasma wird im Allgemeinen in Prozent (%) relativ zu einem Pool von Normalplasma angegeben. Der Normalwert bei Verwendung normaler Plasmaproben mit dem vWF:Ag Test betrug 47 - 197% (Mittelwert 105,8%, Std. abw. 39%). Dieser Bereich entspricht den in der Literatur^{4,7} veröffentlichten und von anderen Testherstellern angegebenen Normalbereichen (50 - 160%). Proben, deren Werte oberhalb des Bereichs der Eichkurve liegen, müssen u. U. verdünnt und erneut gemessen werden, um das richtige Ergebnis zu erhalten.

LEISTUNGSEINGENSCHAFTEN¹⁰

Nachweisbereich:

Der Nachweisbereich für den Test vWF-Ag von Helena BioSciences wurde mit 5 - 200 % bestimmt. Allerdings hängt der Messbereich des einzelnen Laufs vom getesteten Wert des Referenzplasmas ab. Proben, die eine Extinktion außerhalb des OD-Bereichs der Referenzkurve ergeben, sollten für bessere Genauigkeit in entsprechender Verdünnung wiederholt werden.

Präzision:

Intraassay-Präzision:

Zur Bestimmung der Schwankungen innerhalb einer Platte wurden drei Plasmaproben mit bekannten vWF-Werten (eine hohe, eine mittlere und eine niedrige) in 16 Vertiefungen auf sechs Platten von je drei Chargen durch zwei Bediener getestet. Die in der folgenden Tabelle dargestellten Daten zeigen über die drei Chargen einen mittleren VK von 3,6 %. Darüber hinaus wurden 99 Patientenproben mit vWF-Werten zwischen 54 - 276 % der Normalwerte im Doppelansatz über 3 Chargen getestet, um zu zeigen, welche Präzision Endverbraucher erwarten können, wenn sie den Test laut Gebrauchsanweisung durchführen. Wie in der Tabelle zu sehen, betrug der Gesamtmittelwert des VK für die Duplikate 2,5 %

Interassay-Präzision:

Zehn getestete, kommerziell hergestellte Plasmaproben mit vWF-Werten von 57 - 159 % wurden im Doppelansatz mit drei Chargen untersucht, um die Präzision zwischen den Chargen zu bestimmen. Der mittlere Interassay-VK betrug 5 % (siehe Tabelle).

VON WILLEBRAND FAKTOR ANTIGENS (vWF:AG)

Intraassay Präzision (Schwankungen innerhalb einer Platte)	vWF-Bereich (% des Normalwerts)	VK-Bereich(3 Pilotchargen)	Gesamtmittelwert VK:
Replikate (x16):	149% - 155%	1,9 - 7,9%	
	75% - 89%	2,2 - 7,7%	
	57% - 83%	1,8 - 9,9%	3,6%
Duplikate:	54% - 276%		2,5%
Interassay Präzision (Schwankungen zwischen den Chargen) Duplikate:	57% - 159%	3,0 - 12,1%	5,0%

Linearität:

Zweifache Verdünnungsreihen von vWF-Referenzplasmaproben, die mit drei Chargen vWF-Ag-Test von Helena BioSciences getestet wurden, zeigten Kurven mit einem mittleren Bestimmtheitsmaß (R-Squared) von 0,995. Die Wiederfindung einzelner Punkte lag im Bereich von -10,7% bis +14,0 %.

Genauigkeit:

Die Genauigkeit wurde durch Testen von Referenzplasmagemischen mit vorher bestimmten Werten mit dem vWF-Ag-Test von Helena BioSciences und Errechnung der Wiederfindung theoretischer Werte bestimmt. Der mittlere Gesamtprozentwert der Wiederfindung über die 3 Chargen betrug 103,6 % mit einer durchschnittlichen Abweichung von 5.7 %.

GRENZEN DES TESTS

Die Werte der Konzentration von vWF:Ag, die mit diesem Test erhalten werden, sind als Hilfestellung zur Diagnose anzusehen. Jeder Arzt muss dieses Ergebnis unter Einbeziehung des Krankheitsablaufes, der Patientendaten, des physischen Befundes und anderen diagnostischen Untersuchungen betrachten. Die normalen Plasma-vWF:Ag-Werte unterliegen bestimmten Schwankungen, deren Ursache derzeit noch nicht bekannt ist. Daher muss die Bestimmung u. U. wiederholt werden. Darüber hinaus verhält sich vWF:Ag wie ein Akutphasenindikator. Es kann in verschiedenen Belastungssituationen und bei Krankheitszuständen, wie z. B. Schwangerschaft, Einnahme oraler Kontrazeptiva, Operationen, Leberkrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Prostatakrebs etc. erhöht sein.^{4,5} Durch Fehler bei der Blutabnahme oder beim Verarbeiten der Plasmaproben im Labor kann vWF:Ag unbeabsichtigterweise abgebaut oder zerstört werden. Personen mit Blutgruppe O weisen niedrigere Plasmaspiegel von vWF:Ag (~ 25%) als Personen mit anderen Blutgruppen auf. Bei Personen mit lymphoproliferativer Erkrankung kann ein erworbenes von Willebrand-Jürgens Syndrom vorliegen.⁷ Wie bei jedem Test mit Antikörpern aus tierischen Quellen (z. B. Maus, Kaninchen, Ziege etc.) zum Binden eines Zielmoleküls besteht auch hier die Gefahr von Störungen im Serum oder Plasma von Patienten, die zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen einer Therapie oder Diagnosestellung Zubereitungen mit tierischen Antikörpern ausgesetzt waren. Bei solchen Patienten können erhöhte oder erniedrigte Werte im Ergebnis falsch sein.

Per uso diagnostico in vitro

USO PREVISTO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione quantitativa dell'antigene del fattore von Willebrand (vWF:Ag) nel plasma umano citrato.

PRINCIPIO DEL TEST

Il dosaggio vWF:Ag e un saggio ELISA a sandwich. Un anticorpo di cattura specifico per il vWF umano viene usato per rivestire piastre di polistirolo a 96 pozzetti. Il plasma diluito, prelevato da pazienti, viene incubato nei pozzetti, consentendo al vWF:Ag disponibile di legarsi agli anticorpi anti-vWF umano presenti sulla superficie dei pozzetti. Le piastre vengono quindi lavate per eliminare le proteine non legate o altre molecole di plasma. La determinazione quantitativa del vWF:Ag legato viene eseguita utilizzando anticorpi di individuazione anti-vWF umano coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo l'incubazione, il coniugato non legato viene eliminato mediante lavaggio. Per sviluppare una reazione colorata, si aggiunge un substrato cromogeno a base di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H_2O_2). L'intensità del colore si misura in unità di densità ottica (O.D.) con uno spettrofotometro a 450 nm. Il vWF:Ag di pazienti, in concentrazioni percentuali relative, viene determinato rispetto ad una curva preparata con il plasma di riferimento incluso nel kit.

REAGENTI

Conservare a 2...8°C. Non congelare.

Ogni kit per il dosaggio dell'antigene del fattore von Willebrand (vWF:Ag) a 96 pozzetti contiene i seguenti reagenti:

- 12 x 8 pozzetti rivestiti di anticorpi anti-fattore von Willebrand umano (96 Antibody Coated Microwells).
- 60 ml di diluente per campioni (soluzione blu-verde); contiene sodio azide (Sample Diluent III).
- 3 x 0,5 ml di plasma di riferimento liofilizzato, con scheda di dosaggio (Reference Plasma).
- 12 ml di coniugato anti-vWF umano - HRP (soluzione rossa) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml di substrato (TMB and H_2O_2) (One-component Substrate).
- 15 ml di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) (Stopping Solution).
- 30 ml di concentrato di lavaggio (33X di soluzione fisiologica tamponata con fosfato e 0,01% di detergente tipo Tween 20). N.B. Il concentrato di lavaggio può esibire un aspetto torbido che non influisce sulle prestazioni dei componenti e che dovrebbe scomparire durante la preparazione della diluizione pronta all'uso (Wash Concentrate).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

1. Il materiale di origine umana usato per preparare il plasma di riferimento incluso in questo kit è stato analizzato in osservanza dei requisiti dell'FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti gli emoderivati di origine umana, inclusi i campioni da pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. La soluzione di substrato mono-componente può causare irritazione agli occhi e alla cute. È possibile l'assorbimento attraverso la cute. Usare i guanti quando si maneggia il substrato e lavarsi bene le mani subito dopo. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.

ANTIGENE DEL FATTORE VON WILLEBRAND (VWF:AG)

6. Il diluente per campioni contiene sodio azide come conservante. È stato riportato che il sodio azide può formare azidi di rame e di piombo quando viene lasciato a contatto con questi metalli. Tali composti azidici sono esplosivi. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere sciacquate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.

ACQUISIZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Come matrice dei campioni, usare plasma raccolto con 3,2% o 3,8% di citrato di sodio come anticoagulante. Il sangue deve essere prelevato mediante venipuntura e il campione deve essere centrifugato immediatamente. Rimuovere il plasma e conservarlo a 2...8°C fino al momento di eseguire l'analisi. Se il campione non viene analizzato entro 8 ore dal prelievo, conservarlo a -70°C e analizzarlo entro un mese.

ISTRUZIONI PER L'USO

MATERIALI FORNITI

Kit per il dosaggio dell'antigene del fattore von Willebrand; per un elenco completo, vedere 'Reagenti'.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Plasma di controllo vWF:Ag - per ricostituire il plasma di controllo selezionato per l'uso, seguire le istruzioni della ditta produttrice e conservarlo come raccomandato.
- Acqua distillata (circa 1 litro) per preparare la soluzione di lavaggio PBS/Tween 20, per ricostituire il plasma di riferimento e per tarare o azzerare il lettore della piastra nella fase finale del dosaggio
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione in grado di erogare quantità comprese tra 5 e 1000 microlitri, con le punte appropriate
- Vetreria assortita adatta a manipolare piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con la punta leggermente indietro per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso, senza talco (raccomandati)
- Spettrofotometro per piastra in grado di rilevare l'assorbimento a 450nm (possibilmente a 650nm, se disponibile)
- Pipette multicanali per versare in 8 pozzetti simultaneamente
- Provette per microdiluzione da usare per la preparazione dei campioni da pazienti

NOTE PROCEDURALI

1. Portare i campioni di plasma e i reagenti a temperatura ambiente (18...26°C) e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Riportare tutti i prelievi e i reagenti non utilizzati nel congelatore (2...8°C) quanto prima.
2. Tutte le diluizioni del plasma di riferimento, del plasma di controllo selezionato per l'uso e dei campioni da pazienti devono essere preparate immediatamente prima di essere usate nel dosaggio.
3. Preparare un pozzetto bianco per ogni piastra. In questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungere invece 200 µl di acqua distillata al pozzetto immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Questo pozzetto con l'acqua servirà a tarare o ad azzerare il lettore della piastra.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato dirigere un getto vigoroso di soluzione di lavaggio erogata da un flacone di plastica morbida con una punta larga nel fondo dei pozzetti. La presenza di soluzione di lavaggio nel bianco non interferirà con la procedura. È anche possibile utilizzare un sistema di lavaggio automatico per piastre per microtitolazione.

5. **IMPORTANTE** - I residui di PBS/Tween 20 possono causare uno sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale che possa versare in 8 pozzetti simultaneamente. Ciò aumenta la velocità dal test e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi è importantissimo. Tutte le diluizioni del plasma di riferimento, i controlli, e i campioni vanno dispensati nei pozzetti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve essere maggiore della quantità che può essere aggiunta entro questi cinque minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia quando al termine dell'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e con la stessa sequenza.
10. Le temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18...26°C) possono contribuire a dar luogo a risultati errati.
11. Quando si aprono i fiale originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione dei reagenti.
12. Non utilizzare componenti dal kit che abbiano superato la data di scadenza.
13. I pozzetti rivestiti, il coniugato e il substrato sono componenti che fanno parte di un lotto specifico e non devono essere usati con kit di lotti diversi.

Preparazione dei reagenti

1. Soluzione di lavaggio - soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)/Tween 20. Misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS/Tween 20) e diluirlo a 1 litro con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS/Tween 20 non utilizzata a 2...8°C. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione.
2. Ricostituire il plasma di riferimento aggiungendo 0,5 ml di acqua distillata. Roteare leggermente per miscelare. Lasciare riposare per 10 minuti prima dell'uso, per dissolvere completamente il composto. Il composto è stabile per 8 ore se conservato a 2...8°C. Per ricostituire il plasma di controllo appropriato, seguire le istruzioni della ditta produttrice e conservarlo come raccomandato.

Procedura di dosaggio

1. Togliere dall'apposito telaio tutte le strisce di pozzetti che non verranno usate, e conservarle nella sacca in dotazione.
2. Analizzare in duplicato ciascuna diluizione di plasma di riferimento. Si consiglia di eseguire determinazioni in duplicato anche per quanto riguarda i campioni da pazienti e i controlli. Un pozzetto deve essere analizzato come bianco reagente. Dispensare nel pozzetto il diluente per campioni senza plasma come spiegato nel passaggio 6 di questa sezione. In tutte le fasi successive del test, questo pozzetto viene trattato come un campione da pazienti. Con ogni piastra occorre includere un pozzetto bianco, che dovrà rimanere vuoto finché non si aggiungono 200 µl di acqua distillata al termine del dosaggio, immediatamente prima della lettura della piastra. Questo bianco va utilizzato per azzerare il lettore della piastra.
3. Usando il plasma di riferimento incluso nel kit, preparare sei diluizioni di plasma di riferimento, come descritto qui di seguito.

ANTIGENE DEL FATTORE VON WILLEBRAND (VWF:AG)

Volume del plasma di riferimento		Volume del diluente per campioni		* Livello di riferimento
30 μ l	+	500 μ l	=	150
20 μ l	+	500 μ l	=	100
15 μ l	+	500 μ l	=	75
10 μ l	+	500 μ l	=	50
10 μ l	+	1000 μ l	=	25
10 μ l	+	2000 μ l	=	12.5
**10 μ l	+	**4000 μ l	=	6.25

- * Valore del livello di riferimento da usare solo per costruire la curva di riferimento.
- ** Effettuare una diluizione supplementare se il valore del dosaggio del plasma di riferimento è \geq 150%.
- Preparare diluizioni in rapporto 1:26 di ciascun campione da pazienti e di plasma di controllo selezionato per l'uso con diluente per campioni (soluzione blu-verde); ad esempio, aggiungere 20 μ l di campione a 500 μ l di diluente per campioni. Miscelare accuratamente.
 - Aggiungere 100 μ l delle diluizioni (plasma di riferimento x 6 campioni da pazienti e controlli) ai pozzetti appropriati.
 - Aggiungere 100 μ l di diluente di campioni al pozzetto bianco reagente. Lasciare vuoto il pozzetto bianco.
 - Far incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare il liquido. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i prelievi.
 - Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS)/Tween 20). Ciascun pozzetto deve essere riempito con soluzione di lavaggio per lavaggio. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto vuoto del bianco non interferisca con la procedura. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro e svuotare il liquido. Con un movimento deciso del polso scuotere il liquido nei pozzetti causandone la fuoriuscita. Il telaio dei pozzetti va schiacciato al centro in alto e in basso per trattenere i pozzetti durante il lavaggio. Asciugare le ultime gocce di liquido con carta assorbente. Evitare che i pozzetti si asciugino tra le varie fasi.
 - Aggiungere 100 μ l di coniugato (rosso) a ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco).
 - Far incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato.
 - Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS)/Tween 20) come indicato nel passaggio 8. La presenza di soluzione di lavaggio nel bianco non interferisca con la procedura. Drenare il liquido con un movimento a scatto e asciugare con carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciugino.
 - Aggiungere 100 μ l di substrato in ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco) e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Aggiungere il substrato nei pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con prelievi positivi si svilupperà un colore blu.

13. Aggiungere 100 μ l di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) in ciascun pozzetto (tranne che nel pozzetto bianco) per arrestare la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere ai pozzetti la soluzione di arresto nello stesso ordine ed alla stessa velocità con cui è stata aggiunta la soluzione di substrato. La soluzione blu di substrato diventa gialla, mentre il substrato incolore rimane tale. Non aggiungere la soluzione di arresto nel pozzetto bianco. Al pozzetto bianco aggiungere invece 200 μ l di acqua distillata. Tarare o azzerare il lettore della piastra confrontandolo al pozzetto bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm, confrontandola ad un filtro di riferimento a 650 nm (se disponibile). Per ottenere risultati ottimali, i valori della densità ottica devono essere misurati entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

RISULTATI

1. Calcolare i valori medi della densità ottica per i duplicati delle diluizioni del plasma di riferimento, dei controlli selezionati per l'uso e dei campioni da pazienti.
2. Tracciare un grafico del valore medio della densità ottica ottenuto per ciascuna diluizione del plasma di riferimento (asse x) rispetto al valore corrispondente del livello di riferimento (asse y). La curva può essere tracciata su un grafico lineare, semi-log o log-log. Tracciare una riga per collegare i punti.
3. Utilizzando il valore medio della densità ottica, determinare in base al grafico i valori relativi del controllo e del paziente, oppure usare la regressione lineare per eseguire il calcolo in base alla curva di riferimento.
4. Per calcolare il livello di vWF:Ag come percentuale (%) del valore normale, moltiplicare i valori relativi dei controlli e dei pazienti (ricavati dalla curva di riferimento), per il valore assegnato del plasma di riferimento (vedere l'etichetta del flacone).

Ad esempio:

valore relativo del paziente (curva di riferimento): 40

valore assegnato del plasma di riferimento: 105% del valore normale

Valore effettivo del vWF:Ag del paziente (come % del valore normale): $40 \times 1,05 = 42\%$

5. Assicurarsi che siano stati soddisfatti tutti i parametri di controllo di qualità (vedere Controllo di qualità) prima di riportare i risultati del test.

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Quando lo spettrofotometro è stato tarato sul pozzetto bianco, la densità ottica media del bianco reagente deve essere inferiore a 0,1. Valori più alti di 0,1 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente, o insufficiente lavaggio della piastra.
2. I valori della densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni da pazienti devono rimanere entro il 20% della densità ottica media per i campioni con valori di assorbanza superiori a 0,200.
3. I valori del vWF:Ag ottenuti per i controlli devono essere compresi nei range ELISA assegnati dalla ditta produttrice. Tuttavia, piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi intervalli possono essere accettabili.
4. Ogni laboratorio deve determinare periodicamente il proprio range di riferimento per questo dosaggio.

ANTIGENE DEL FATTORE VON WILLEBRAND (vWF:Ag)

VALORI ATTESI¹⁰

Valori di riferimento: I valori plasmatici del vWF:Ag vengono generalmente espressi come percentuale relativa (%) rispetto al pool di plasma normale. Il range normale ottenuto analizzando campioni di plasma normale mediante il dosaggio vWF:Ag è risultato compreso tra 47 - 197% (media 105,8%, DS 39%). Questi range sono coerenti con quelli pubblicati nella letteratura attinente^{4,7} e riportati da altri sistemi di dosaggio disponibili in commercio (50 - 160%). Per ottenere risultati accurati, i campioni con valori superiori al range della curva di riferimento possono essere diluiti e rianalizzati.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI¹⁰

Range di rilevamento:

Si è calcolato che il range di rilevamento del dosaggio vWF:Ag di Helena BioSciences è compreso tra il 5 e il 200%. In realtà il range effettivo di ciascun'analisi dipende dal valore di dosaggio del plasma di riferimento. Per ottenere la massima precisione si consiglia di ritestare con un'appropriata diluizione quei campioni le cui letture dell'assorbanza non rientrano nel range O.D. della curva di riferimento.

Precisione:

Precisione intra-assay:

Al fine di stabilire la variabilità all'interno di una piastra, due operatori hanno testato tre campioni di plasma con livelli vWF noti (uno alto, uno medio e uno basso) in 16 pozzetti utilizzando sei piastre per ciascuno dei tre lotti. I dati, presentati nella seguente tabella, mostrano una media CV del 3,6% nei tre lotti. Sono stati inoltre testati in duplicato per 3 lotti i campioni di novantanove (99) pazienti con livelli vWF compresi tra il 54 e il 276% del normale per stabilire la precisione che l'utente finale può aspettarsi quando esegue un dosaggio conformemente alle istruzioni riportate sull'inserito della confezione. Come mostrato nella tabella, la media complessiva CV dei duplicati è stata del 2,5%.

Precisione inter-assay:

Sono stati testati in duplicato su tre lotti dieci (10) campioni di plasma preparati commercialmente con valori vWF compresi tra il 57 e il 159% per stabilire la precisione del dosaggio tra lotti. La media inter-assay CV è stata del 5% come riportato in tabella:

Precisione intra-assay (variabilità all'interno di una piastra)	Range vWF(% del normale)	Range CV (3 lotti pilota)	Media complessiva CV:
Copie (x 16):	149% - 155%	1,9 - 7,9%	
	75% - 89%	2,2 - 7,7%	
	57% - 83%	1,8 - 9,9%	3,6%
Duplicati:	54% - 276%		2,5%
Precisione intra-assay (variabilità tra lotti) Duplicati:	57% - 159%	3,0 - 12,1%	5,0%

Linearità:

Diluizioni seriali doppie di campioni di plasma di riferimento vWF testati su tre lotti del dosaggio vWF:Ag di Helena BioSciences hanno prodotto curve con un coefficiente di determinazione medio (r quadro) di 0,995; il recupero in punti percentuali era compreso tra il -10,7% e il +14,0%.

Precisione:

Per determinare la precisione si sono testate miscele di plasma di riferimento con valori predeterminati in base al dosaggio vWF:Ag di Helena BioSciences e se ne è calcolato il recupero dei valori teorici. Il recupero percentuale medio complessivo su tre lotti è stato del 103,6% con una variazione media del 5,7%.

LIMITI DEL TEST

I livelli di vWF:Ag ottenuti con questi dosaggi sono solo uno strumento di ausilio per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altri procedimenti diagnostici. La normale oscillazione plasmatica di vWF:Ag dipende da meccanismi sconosciuti. Per questo motivo, potrebbe essere necessario ripetere i dosaggi. Inoltre, il vWF:Ag si comporta come un reattivo di fase acuta; può aumentare in varie condizioni di stress, nel corso di malattie e a causa di gravidanza, assunzione di contraccettivi orali, interventi chirurgici, epatopatie e malattie autoimmuni, cancro della prostata, ecc.^{4,5} Il vWF:Ag presente nei campioni può essere inavvertitamente sottratto o degradato a causa di errori durante il prelievo del campione o il trattamento in laboratorio. I soggetti con gruppo sanguigno 'O' hanno evidenziato livelli plasmatici inferiori di vWF:Ag (~ 25%) rispetto a quelli con altri gruppi sanguigni. Il morbo di von Willebrand acquisito è stato osservato in alcuni pazienti con sindrome linfoproliferativa.⁷ Come per qualsiasi dosaggio che utilizza anticorpi di origine animale (come topo, coniglio, capra, ecc.) per catturare una molecola bersaglio, esiste la possibilità di interferenza nel siero o nel plasma di pazienti che sono stati esposti, per motivi diagnostici o terapeutici, a preparazioni contenenti anticorpi di origine animale. In questi pazienti è possibile osservare valori falsamente elevati o ridotti.

FACTOR ANTIGENICO DE VON WILLEBRAND (vWF:Ag)

Solo para uso diagnostico in vitro

INDICACIONES

Un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa de factor antigénico de von Willebrand (vWF:Ag) en plasma humano citratado.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo del vWF:Ag es un ELISA de tipo sandwich. Para llevarlo a cabo se recubren placas de poliestireno de 96 micropocillos con un anticuerpo de captura específico para el vWF humano. El plasma diluido del paciente se incuba en los pocillos, lo que permite que el vWF:Ag disponible se una a los anticuerpos del vWF antihumano de la superficie de los micropocillos. Las placas se lavan para retirar las proteínas no retenidas u otras moléculas plasmáticas. El vWF:Ag retenido se cuantifica utilizando anticuerpos de detección del vWF antihumano conjugados con enzimas peroxidasa (HRP). Tras la incubación, los conjugados no retenidos se retiran mediante lavado. Se añade un sustrato cromógeno de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para desarrollar una reacción coloreada. La intensidad del color se mide en unidades de densidad óptica (D.O.) con un espectrofotómetro a 450nm. Los porcentajes de concentración relativos de vWF en el plasma del paciente se determinan respecto a una curva elaborada a partir del plasma de referencia incluido con el equipo.

REACTIVOS

Conservelos entre 2...8°C. No los congele.

Cada prueba del factor antigénico de von Willebrand (vWF:Ag) de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos:

- 12 x 8 micropocillos recubiertos de anticuerpos del factor de von Willebrand antihumano (96 Antibody Coated Microwells).
- 60ml de diluyente de muestras (solución azul-verde); contienen azida sódica (Sample Diluent III).
- 3 x 0,5 ml de plasma de referencia liofilizado, con hoja de ensayo (Reference Plasma).
- 12ml de conjugado de vWF antihumano y HRP (solución roja) (HRP-Conjugated Antibody).
- 13 ml de sustrato (TMB y H_2O_2) (One-Component Substrate).
- 15ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) (Stopping Solution).
- 30ml de concentrado de lavado (solución buffer de fosfato 33x con Tween 20 al 0,01%).

NOTA: en el concentrado de lavado puede aparecer turbidez que no afectará a la actuación de los componentes y desaparecerá cuando se prepare la dilución de trabajo (Wash Concentrate).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Solo para uso diagnostico in vitro

1. El material de origen humano empleado para preparar el plasma de referencia incluido con este equipo se ha examinado y resultado negativo en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV) y de los VIH I y II requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma o beba en áreas donde se manipulen especímenes o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables al manipular los reactivos del equipo y lávese las manos minuciosamente después de su uso.

5. La solución de sustrato de un componente puede causar irritación ocular o cutánea. Es posible la absorción a través de la piel. Use guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.
6. El diluyente de muestras contiene azida sodica como conservante. Se ha observado que la azida sodica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías.

RECOLECCION Y PREPARACION DE ESPECIMENES

Como muestra debe emplearse el plasma obtenido con citrato de sodio al 3,2 o 3,8% como anticoagulante. La sangre debe extraerse por venopunción, y la muestra ha de centrifugarse inmediatamente. Extraiga el plasma y consérvelo entre 2...8°C hasta que pueda realizarse el análisis. Si la muestra no se examina en las ocho horas posteriores a la obtención, deberá conservarse a -70°C y examinarse antes de un mes.

INSTRUCCIONES DE USO MATERIALES PROVISTOS

Prueba del factor antigénico de von Willebrand ; véase una lista completa en 'Reactivos'.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Plasma de control para vWF:Ag: Reconstituya el plasma de control seleccionado para utilizarlo según las instrucciones del fabricante y consérvelo de la forma recomendada.
- Agua destilada (1 litro) para preparar solución de lavado de PBS y Tween 20, para reconstituir el plasma de referencia y para poner a cero o borrar la lectura de la placa durante el paso final del ensayo
- Probetas
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 5 y 1000 microlitros, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o botella de 1 litro
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o un sistema automático o semiautomático de lavado
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin talco
- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450nm (con referencia de 650nm si se encuentra disponible)
- Pipetas multicanal capaces de dispensar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos
- Tubos de microdilución para la preparación de la muestra del paciente

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Deje que las muestras de plasma y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente (entre 18...26°C) y mezclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Devuelva todas las muestras y reactivos sin usar al almacenamiento refrigerado (entre 2...8°C) en cuanto sea posible.
2. Todas las diluciones del plasma de referencia, el plasma de control elegido y las muestras de los pacientes deben prepararse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.

FACTOR ANTIGENICO DE VON WILLEBRAND (VWF:AG)

3. En cada placa debe dejarse un pocillo testigo agua. No deben anadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, anada 200 μ l de agua destilada a este pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrometro. El lector de placas debe programarse para que la densidad optica del pocillo del blanco se sustraiga de las densidades opticas del resto de los pocillos.
4. Una buena tecnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solucion de lavado a presion apretando una botella de plastico de punta ancha dentro del fondo de los micropocillos. La solucion de lavado en el pocillo testigo de agua no interfiera con el procedimiento. Tambien puede utilizarse un sistema de lavado automatico de microplacas.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS y Tween 20, la solucion de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de dispensar a 8 pocillos simultaneamente. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reaccion e incubacion mas uniformes a todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todas las diluciones del plasma de referencia, los controles y las muestras deben anadirse a los micropocillos en un plazo maximo de 5 minutos. El tamano del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede anadirse en este periodo de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubacion comienza a partir de la aplicacion del ultimo reactivo o muestra.
9. El anadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubacion superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18...26°C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminacion de los reactivos al abrir y extraer alicuotas de los frascos primarios.
12. No utilice los componentes del equipo despues de la fecha de caducidad.
13. Los micropocillos recubiertos, el conjugado y el sustrato son componentes especificos del lote, y no deben emplearse con lotes diferentes del equipo.

Preparacion del reactivo

1. Solucion de lavado (solucion buffer de fosfato [PBS] y Tween 20): Mida 30 ml de concentrado de lavado (PBS 33x y Tween 20) y diluyalos en agua destilada hasta obtener un litro de solucion. El pH de la solucion final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solucion de PBS y Tween 20 sin usar entre 2...8°C. Deseche la solucion si muestra signos de contaminacion.
2. Reconstituya el plasma de referencia anadiendo 0,5 ml de agua destilada. Remuevalo ligeramente para que se mezcle. Para que se disuelva por completo, dejelo reposar 10 minutos antes de utilizarlo. Se mantendra estable durante 8 horas cuando se conserve entre 2...8°C. Reconstituya el plasma de control apropiado segun las instrucciones del fabricante y conservalo de la forma recomendada.

Procedimiento del ensayo

1. Retire del marco las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guardelas en la bolsita suministrada.
2. Analice cada dilucion de plasma de referencia por duplicado. Para analizar las muestras de control o de los pacientes tambien se recomienda realizar las determinaciones por duplicado. Un pocillo debe procesarse como reactivo testigo; se anade diluyente de muestras sin plasma al pocillo,

tal como se explica en el paso 6 de este apartado. Este pocillo se trata de la misma forma que las muestras de pacientes en los siguientes pasos del ensayo. Debe incluirse un pocillo testigo de agua con cada placa que debe permanecer vacío hasta que se añadan 200 μl de agua destilada al completar el ensayo, inmediatamente antes de la lectura de la placa. El pocillo testigo de agua debe usarse para poner a cero el lector de placas.

- Con el plasma de referencia incluido con el equipo, prepare seis diluciones de plasma de referencia de la forma descrita a continuación.

Volumen de plasma de referencia		Volumen de diluyente de muestras		* Nivel de referencia
30 μl	+	500 μl	=	150
20 μl	+	500 μl	=	100
15 μl	+	500 μl	=	75
10 μl	+	500 μl	=	50
10 μl	+	1000 μl	=	25
10 μl	+	2000 μl	=	12.5
**10 μl	+	**4000 μl	=	6.25

* El valor del nivel de referencia solo se utiliza para construir la curva de referencia.

** Haga una dilución adicional si el valor obtenido con el plasma de referencia es \geq 150%.

- Prepare una dilución al 1:26 de cada muestra de los pacientes y plasma de control que se vayan a utilizar en el diluyente de muestras (solución azul-verde); p. ej., 20 μl añadidos a 500 μl de diluyente de muestras. Mezcle bien.
- Añada 100 μl de las diluciones (plasmas de referencia $\times 6$, muestras del paciente y controles) a los micropocillos apropiados.
- Añada 100 μl de diluyente de muestras al pocillo testigo de reactivo. Deje vacío el pocillo testigo de agua.
- Incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche el líquido. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
- Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20). Cada pocillo debe llenarse con solución de lavado en cada uno de los lavados. La solución de lavado en el pocillo vacío que se va a utilizar como pocillo testigo de agua no interfiera con el procedimiento. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. El marco debe presionarse en el centro por la parte superior e inferior para que no se caigan los módulos de micropocillos durante el lavado. Seque con papel secante para retirar los restos de líquido de lavado. No debe permitirse que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
- Añada 100 μl de conjugado (rojo) a cada pocillo (excepto al pocillo testigo de agua).
- Incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche la solución conjugada.
- Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20), como en el paso 8. La solución de lavado en el pocillo testigo de agua no interfiera con el procedimiento. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con papel absorbente tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.

FACTOR ANTIGENICO DE VON WILLEBRAND (VWF:AG)

12. Anada 100 μ l de solución de sustrato a cada pocillo (con excepción del pocillo testigo de agua) e incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Anada solución de sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
13. Anada 100 μ l de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo (con excepción del pocillo testigo de agua) para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y al mismo ritmo con el que se añadió la solución de sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y el sustrato incoloro permanecerá igual. No anada solución de parada al pocillo testigo de agua. En su lugar, anada 200 μ l de agua destilada al pocillo testigo de agua. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto al pocillo testigo de agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm, respecto a un filtro de referencia de 650 nm (si se encuentra disponible). Para obtener un resultado óptimo, los valores de la D.O. deben leerse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

RESULTADOS

1. Calcule los valores medios de la D.O. de los duplicados del plasma de referencia, de las diluciones, de los controles que se vayan a utilizar y de las muestras de los pacientes.
2. Trace las D.O. medias obtenidas con cada dilución del plasma de referencia (eje x) respecto al valor correspondiente del nivel de referencia (eje y). La curva puede trazarse sobre un gráfico lineal, semi-log o log-log. Trace una línea para conectar los puntos.
3. Utilice la D.O. media para determinar los valores relativos de controles y pacientes a partir del gráfico; también puede utilizar la regresión lineal para calcular a partir de la curva de referencia.
4. Para calcular los niveles de factor vWF:Ag en porcentajes (%) de lo normal, multiplique los valores relativos de controles y pacientes (obtenidos a partir de la curva de referencia) por el valor asignado del plasma de referencia (consulte la etiqueta del frasco).

Por ejemplo:

Valor relativo del paciente (de la curva de referencia): 40

Valor asignado del plasma de referencia: 105% de lo normal

Valor real de factor vWF:Ag (en porcentaje de lo normal): $40 \times 1,05 = 42\%$

5. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (ver Control de calidad) antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

CONTROL DE CALIDAD

1. La D.O. media del testigo de reactivo debe ser inferior a 0,1 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto al pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,1 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
2. Los valores de la D.O. de los duplicados de los controles y las muestras de los pacientes deben estar a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
3. Los valores de vWF:Ag obtenidos en los controles deben estar dentro de los rangos del ELISA asignados por el fabricante. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos pueden ser aceptables.
4. Cada laboratorio debe determinar periódicamente su propio rango de referencia para este ensayo.

VALORES ESPERADOS¹⁰

Rango normal: Generalmente, los valores de vWF:Ag en plasma se expresan en porcentajes relativos (%) de los del plasma normal combinado. El rango normal cuando se examinaron muestras de plasma normales mediante el ensayo del vWF:Ag fue 47 - 197% (media: 105,8%, desviación estándar: 39%). Este rango es similar a los citados en la bibliografía^{4,7} y en las especificaciones de otros ensayos disponibles en el mercado (50 - 160%). Las muestras que obtengan valores superiores al rango de la curva de referencia pueden tener que diluirse y volver a examinarse para obtener resultados precisos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO¹⁰

Rango de detección:

Se ha determinado que el rango de detección para el ensayo vWF:Ag de Helena BioSciences es del 5 - 200%. Sin embargo, el rango efectivo de cada determinación dependerá del valor ensayado del plasma de referencia. Para mayor exactitud, las muestras que generan lecturas de absorbancia fuera del rango de D.O. de la curva de referencia deben volverse a estudiar en una dilución adecuada.

Precisión:

Precisión intra-ensayo:

Para determinar la variabilidad dentro de una placa, dos operadores estudiaron tres muestras de plasma con niveles conocidos de vWF (uno alto, uno medio y uno bajo) en 16 pocillos, en seis placas de cada uno de tres lotes. Los datos, presentados en la tabla siguiente, muestran un CV medio de 3,6% en los tres lotes. Además, se estudiaron por duplicado noventa y nueve (99) muestras de pacientes con niveles de vWF que iban del 54 al 276% de la normalidad en 3 lotes para demostrar la precisión que podrían esperar los usuarios finales al realizar un ensayo según las instrucciones del prospecto. Como se muestra en la tabla, el CV medio global de los duplicados fue del 2,5%.

Precisión inter-ensayos:

Se estudiaron por duplicado diez (10) muestras de plasma preparadas comercialmente y ensayadas, con valores de vWF que iban del 57 al 159% en tres lotes para determinar la precisión del ensayo entre lotes. El CV medio interensayo fue del 5%, como se ve en la tabla:

Precisión intraensayo (variabilidad dentro de una placa)	Rango de vWF (% del normal)	Rango de CV (3 lotes piloto)	CV medio global:
Replicados (x 16):	149% - 155%	1,9 - 7,9%	
	75% - 89%	2,2 - 7,7%	
	57% - 83%	1,8 - 9,9%	3,6%
Duplicados	54% - 276%		2,5%
Precisión interensayo (variabilidad entre lotes) Duplicados:	57% - 159%	3,0 - 12,1%	5,0%

Linealidad:

Diluciones seriadas (cada una al doble de la anterior) de muestras plasmáticas de referencia de vWF estudiadas en tres lotes del ensayo vWF:Ag de Helena BioSciences demostraron curvas con coeficiente de determinación medio (r -cuadrado) de 0,995; la recuperación de puntos individual varió de -10,7% to +14,0%.

Exactitud:

Se determinó la exactitud estudiando mezclas de prueba de plasma de referencia con valores predeterminados en el ensayo vWF:Ag de Helena BioSciences y calculando la recuperación de los valores teóricos. La recuperación porcentual media global en los 3 lotes fue del 103,6%, con una variación promedio del 5,7%.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los niveles de vWF:Ag obtenidos en este ensayo constituyen unicamente una ayuda diagnostica. Cada medico debe interpretar estos resultados basandose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploracion fisica y otros procedimientos diagnosticos. Hay una fluctuacion plasmatica normal del vWF:Ag debida a mecanismos desconocidos, por lo que puede ser necesario repetir la prueba. Además, el vWF:Ag actúa como reactivo de fase aguda; puede tener niveles altos en varias condiciones estresantes y en enfermedades, que incluyen embarazo, anticonceptivos orales, intervenciones quirúrgicas, nefropatías, enfermedades autoinmunitarias, cáncer de próstata, etc.^{4,5}

El vWF:Ag de las muestras de plasma puede agotarse o degradarse inadvertidamente si no se utiliza un método de obtención o un procesamiento de laboratorio apropiados. Se ha demostrado que los individuos con grupo sanguíneo 'O' tienen menores niveles plasmáticos de vWF:Ag (~ 25%) que los de otros grupos sanguíneos. Se ha observado que algunos pacientes con enfermedad linfoproliferativa presentan enfermedad de von Willebrand adquirida.⁷ Como en todos los ensayos que utilizan anticuerpos de origen animal (p. ej., ratones, conejos, cabras, etc.) para capturar una molécula determinada, cabe la posibilidad de que haya interferencias en el suero o plasma de los pacientes a los que se les haya administrado preparados que contengan anticuerpos animales con fines diagnósticos o terapéuticos. En estos pacientes pueden observarse valores espurios altos o bajos.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-0674P 2007/09 (3)